

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-92300

⑬ Int. Cl.³
 C 12 Q 1/68
 G 01 N 33/50
 33/58

識別記号 庁内整理番号
 A 6807-4B
 P 7055-2G

⑭ 公開 平成2年(1990)4月3日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全25頁)

⑮ 発明の名称 選択可能な切断部位を用いたポリヌクレオチドの測定
 ⑯ 特願 昭63-250726
 ⑰ 出願 昭63(1988)10月4日
 優先権主張 ⑱ 1988年9月29日 ⑲ 米国(US)⑳ 251,152
 ㉑ 発明者 マイケル エス. アー アメリカ合衆国 カリフォルニア 94507 アラモ, バン
デイア ス メドウ ロード 100
 ㉒ 出願人 チロン コーポレイション アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608 エミリービ
ル, ホートン ストリート 4560
 ㉓ 代理人 弁理士 山本 秀策

明細書

1. 発明の名称

選択可能な切断部位を用いたポリヌクレオチドの測定

2. 特許請求の範囲

1. 核酸試料中に存在する核酸分析物の興味あるオリゴヌクレオチド配列の存在を検出する方法であって、

該核酸試料を、ハイブリダイゼーション条件下でポリヌクレオチド試薬と混合する工程であって、該試料または該試薬の成分のうちの一方が支持体に結合し、該分析物と該ポリヌクレオチド試薬とのハイブリダイゼーションによって、選択可能な切断部位で該支持体に結合している標識を与える工程；

該支持体を、該支持体に結合している標識から、該選択可能な切断部位以外により実質的に遊離させる工程；

該切断部位で切断する工程；および

該支持体から遊離した標識を検出する工程、

を包含する方法。

2. 核酸試料中に存在する核酸分析物の興味あるオリゴヌクレオチド配列の存在を検出する方法であって、

該核酸を、ハイブリダイゼーション条件下で第1のポリヌクレオチド捕獲プローブおよび第2のポリヌクレオチド標識プローブと混合する工程であって、該第1および第2のプローブが、該分析物中に存在する配列と相補的なオリゴヌクレオチド配列を有し、該ハイブリダイゼーション条件下で第1および第2の二本鎖を形成し、そして該捕獲プローブが固体支持体に結合している工程；

選択されたポリヌクレオチド鎖の置換を導入し、該捕獲プローブと、第1の二本鎖よりも安定な二本鎖を形成し、それにより該支持体を、該支持体に結合している標識から実質体に遊離させる工程；および

該支持体から遊離した標識を検出する工程、

を包含する方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

随意にオリゴヌクレオチド配列を合成し、合成的手法により調製したポリヌクレオチド配列、または天然に存在する起源より得たポリヌクレオチドをクローン化する能力は、例えば染色体、配列混合物、mRNAなどのような広範囲に及ぶオリゴヌクレオチド配列中における特定配列の存在を検出する機会を大きく発展させた。特定配列に関する興味には、その機会の例をいくつか挙げれば、病原体の存在の診断、対立形質の存在の決定、宿主ゲノム中における損傷の存在、特定のmRNAの検出、あるいは宿主細胞の変異をモニターすることが伴い得る。試料中の様々な抗原の存在を診断する分析を行なうために抗体を利用することは、放射性免疫分析の出現により、技術およびプロトコルが非常に発展したが、DNAプローブの領域では、それに匹敵する活性が最近まで見られなかった。それ故、配列の検出は、大体、ポリヌクレオチド配列を支持体へ結合させることと、放射標識したプローブを用いることとを必要とする様々なハイブ

リダーゼーション技術を伴っている。

多量のオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション配列を経済的な方法で生産する能力の増大を考慮すると、研究者の注目は、簡便、正確、かつ効率的に特定のオリゴヌクレオチド配列を検出する技術に向けられる。望ましくは、これらの技術は、迅速であり、技術者が誤りを犯す機会を最小にし、自動化が可能であり、そして簡便かつ正確な検出方法が可能となる。この目的に向けて、標識に結合させるためにオリゴヌクレオチドを誘導する改良された方法だけでなく、放射性同位元素以外の標識でオリゴヌクレオチドプローブを標識する手段およびゲルから支持体へDNA配列を移動させる精度を向上するための努力が既になされている。DNAが様々な起源に由来する種々の場合に興味あるDNA配列を検出するのに柔軟性を考慮した新しいプロトコルを与える必要性が続いている。

(従来の技術)

MeinkothおよびWahlは、*Anal. Biochemistry*(1984) 138: 267-284に、ハイブリダイゼーション技術に

関する優れた総説を与えている。Learyらは、*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* (1983) 80: 4045-4049で、アビジン酵素複合体に結合させたビオチニル化DNAを、特定のオリゴヌクレオチド配列の検出に利用することを述べている。Bankiらは、*Gene*(1983) 21: 77-85で、オリゴヌクレオチド配列を検出するための「サンドウィッチ」ハイブリダイゼーションと呼ばれる方法について述べている。PfeufferおよびHeinrichは、*J. of Biol. Chem.*(1975) 250: 867-876で、セファロース4Bへのグアノシン-5'-O-(3-チオトリホスフェート)の結合について述べている。Baumanらは、*J. of Histochem. and Cytochem.*(1981) 29: 227-237で、蛍光剤によるRNAの3'標識について述べている。PCT出願WO/8302277には、標識するために修飾リボヌクレオチドをDNA断片に付加すること、およびこのようなDNA断片を分析する方法が述べられている。RenzおよびKurzは、*Nucl. Acids Res.*(1984) 12: 3435-3444で、オリゴヌクレオチドに酵素を共有結合させることについて述べている。Wallaceは、*DNA Recombinant*

Technology (Ho, S. 編) CRC Press, Boca Raton, Floridaに、診断におけるプローブの利用について、総括的な背景を与えている。ChouおよびMeriganは、*N. Eng. J. of Med.*(1983) 308: 921-925で、放射性同位元素により標識したプローブをCMVの検出に利用することについて述べている。Inmanは、*Method in Enzymol.* 34B, 24 (1974) 30-59で、ポリアクリルアミドへの結合方法について述べている。他方、Parikhらは、*Methods in Enzymol.* 34B, 24 (1974), 77-102で、アガロースとの結合反応について述べている。Alweineらは、*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* (1977) 74: 5350-5354で、オリゴヌクレオチドをゲルから固体支持体に移動させる方法について述べている。Chinらは、*Nucl. Acids Res.*(1983) 11: 6513-6529で、末端のヌクレオチドを誘導する技術について述べている。Hoらは、*Biochemistry*(1981) 20: 64-67で、リン酸により末端のヌクレオチドを誘導し、エステルを形成させる技術について述べている。AshleyおよびMcDonaldは、*Anal. Biochem.*(1984) 140: 95-103で、表

面に結合した錐型からプローブを調製する方法について報告している。いくつかの技術について述べているこれらの文献は、標識したオリゴヌクレオチドの調製に関する参考文献としてここに採用する。

(発明の要旨)

固体支持体と、少なくとも1つの標識と、試料および標識したプローブが関係しているハイブリダイゼーションとを用いた特定のヌクレオチド配列の検出方法が提供される。該方法においては、二本鎖形成の有無により、支持体と標識との間の空間的な関係を改変する能力が与えられる。この技術の例は、標識したプローブと試料のDNAとの二本鎖形成により、標識と支持体との間の切断部位を与えることである。ここで、二本鎖は支持体に結合している。次いで、該切断部位は切断されて、支持体と標識との分離を生じる。標識の有無の検出は、従来の技術に従って行い得る。

当該分野における本発明の第一の利点は、本発明の方法が、標識の特異的結合と非特異的結合と

を区別することを可能にすることである。従来の技術では、標識は典型的には固体支持体上で検出される。すなわち、試料は、支持体に固定され、標識した相補的なプローブと接触し、次いで該支持体上で二本鎖の形成が分析される。この方法における問題点は、標識が、分析物の非存在下においても支持体に結合し得ることである。支持体に標識が直接結合することを、ここでは、「非特異的」結合と呼ぶ。この非特異的な結合が、相当量生じれば、分析物の有無にかかわらず、標識が支持体上で検出され、誤った陽性の結果を与える。

対照的に、本発明の方法では、標識は興味ある分析物が存在する場合にのみ検出される。すなわち、「特異的」結合だけが検出される。ある好ましい実施態様では、この方法は、試料と1つまたはそれ以上のプローブとの間に二本鎖を形成することによって、支持体と選択された標識との間に切断部位を導入することにより行なわれる。この切断部位は、本出願の優先権主張の基礎となる米国出願の親出願である米国特許出願No.06/661,508

に述べられているように、制限エンドヌクレアーゼ切断部位でもあり得、あるいは数多くの種類の化学的に分解可能な部位（例えば、ジスルフィド結合、過ヨウ素酸分解可能な1,2-ジオールなど）の1つでもあり得る。他の実施態様では、特異的に結合した標識は、鎖置換法によって放出される。該方法では、分析物／プローブ複合体により支持体に標識を結合させた後、分析物／プローブ複合体のある部分に相補的であり、標識した部分に置換して、該標識した部分を放出するように選択されたDNA鎖が導入される。

核酸試料中に存在する核酸分析物の興味あるオリゴヌクレオチド配列の存在を検出する本発明の方法は、該核酸試料を、ハイブリダイゼーション条件下でポリヌクレオチド試薬と混合する工程であって、該試料または該試薬の成分のうちの一方が支持体に結合し、該分析物と該ポリヌクレオチド試薬とのハイブリダイゼーションによって、選択可能な切断部位で該支持体に結合している標識を与える工程；該支持体を、該支持体に結合して

いる標識から、該選択可能な切断部位以外により実質的に遊離させる工程；該切断部位で切断する工程；および該支持体から遊離した標識を検出す工程、を包含する。

核酸試料中に存在する核酸分析物の興味あるオリゴヌクレオチド配列の存在を検出する本発明の他の方法は、該核酸を、ハイブリダイゼーション条件下で第1のポリヌクレオチド捕獲プローブおよび第2のポリヌクレオチド標識プローブと混合する工程であって、該第1および第2のプローブが、該分析物中に存在する配列と相補的なオリゴヌクレオチド配列を有し、該ハイブリダイゼーション条件下で第1および第2の二本鎖を形成し、そして該捕獲プローブが固体支持体に結合している工程；選択されたポリヌクレオチド鎖の置換を導入し、該捕獲プローブと、第1の二本鎖よりも安定な二本鎖を形成し、それにより該支持体を、該支持体に結合している標識から実質的に遊離させる工程；および該支持体から遊離した標識を検出する工程、を包含する。

(発明の構成)

特定の配列の検出はハイブリダイゼーションを用いて行なわれる。それにより、試料DNAとプローブとの二本鎖形成が、標識と支持体との間の空間的な関係を改变する能力に影響を及ぼす。このようにして、試料中における特定配列の有無は、媒体中に放出された標識量によって容易に決定し得る。

主要な方法は、プロトコルおよび試薬の変更を考慮しており、試料の核酸は支持体に結合されるか、あるいは溶液中に遊離した状態であり得る。ある好ましい実施態様では、該方法は核酸の二本鎖を形成することを包含する。標識は選択的に切断可能な結合により支持体から分離される。従って、選択的切断を与える条件下で放出された標識の量は、核酸の試料中における興味ある配列の存在およびその量の尺度となる。選択可能な切断部位は、ホモ二本鎖形成による制限酵素認識部位の形成の結果であるか、あるいはこのような選択可能な部位は、該一本鎖中にこのような部位を導

入した結果であり得る。

試薬としては、核酸の分析物にハイブリダイズする興味あるオリゴヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド配列を含有するものが使用される。この試薬は、ここでは時として「捕獲プローブ」と呼ばれ、本発明の方法では、選択された固体支持体に結合する。興味ある配列を含むか、あるいは含まない標識プローブも使用される。

第1の好ましい実施態様では、主要な方法は、選択可能な切断部位により支持体に結合した標識を与えるハイブリダイゼーション媒体中におけるポリヌクレオチド二本鎖の形成を包含する：試料DNAが支持体に結合するかあるいは溶液中に分散するような様々な方法が使用され得る。

包含される様々なヌクレオチド配列を区別するために、以下の用語が使用され得る：

核酸試料—興味あるオリゴヌクレオチド配列を有する核酸配列を含有すると思われる試料；

核酸の分析物—興味あるオリゴヌクレオチド配列を有する前記核酸試料中のDNAまたはRNA；

興味あるオリゴヌクレオチド配列—ヌクレオチド鎖の全体または一部であり、普通少なくとも6塩基、より普通には少なくとも約10塩基、好ましくは少なくとも約16塩基、そして5kbまたはそれ以上でもあり得るが、通常0.2kbを超えない、DNA配列またはRNA配列。該DNA配列またはRNA配列は検出すべき特性に特徴的である。該特性は遺伝的特性や病原体などに特徴的な遺伝子または配列である。

(以下余白)

ポリヌクレオチド配列—興味あるオリゴヌクレオチド配列の検出用試薬として用いられるDNA配列またはRNA配列。該ポリヌクレオチド配列は、標識しても標識しなくてもよく、支持体に結合させても結合させなくともよく、そして興味あるオリゴヌクレオチド配列に相補的な配列を必ずしも含んでいるわけではない。単独で、または核酸分析物と共に、標識と支持体との間の架橋として作用する1つまたは2つのポリヌクレオチド配列が存在する。該配列は、標識と支持体との間に、選択的に切断可能な部位を有する；そして

選択的に切断可能な部位—選択的に切断することができ、そして制限酵素部位、リン酸エステル、プリン、ペプチド結合などを包含する1つの官能基または複数の官能基である。

説明の便宜のために、選択可能な切断部位を生成する本発明の好ましい実施態様は、さらに4つの主要な実施態様に分割される。これらのうちの第1の実施態様（第2図Aを参照）では、使用される試薬は唯一成分であり、一方の末端の近くで

支持体に結合し、他方の末端の近くで1つまたはそれ以上の検出可能な標識に結合したポリヌクレオチドである。該ポリヌクレオチドには、興味ある配列とホモ二本鎖を形成する少なくとも4つの連続的なヌクレオチドの領域が含まれ、このような配列は支持体と標識との間に相補的な領域を有する。

第2の実施態様（第2図Bを参照）の場合には、使用される試薬は核酸試料が支持体に結合されるか、あるいは結合されないか、および選択可能な切断部位の性質によって異なる2つの成分を有する。核酸試料が支持体に結合している場合、2つの成分は、(1)架橋ポリヌクレオチド配列；および(2)架橋ポリヌクレオチド配列のある部分と相補的であり、ハイブリダイズするポリヌクレオチド配列である。架橋または相補的なポリヌクレオチドのいずれかが標識され得る。架橋配列に結合した標識の存在は、架橋および分析物ポリヌクレオチド配列の二本鎖が選択可能な切断部位として制限酵素部位を定義する場合に限定される。それ以外

の場合には、相補的な配列だけが標識される。相補的な配列と二本鎖を形成する配列を有する以外に、架橋ポリヌクレオチド配列は、興味あるオリゴヌクレオチド配列と二本鎖を形成する領域を有する。

試料核酸が溶液である場合、2つの成分は、(1)支持体に結合した第1のポリヌクレオチドであり、該ポリヌクレオチドは核酸分析物中に存在する配列に相補的な領域を有し、該配列は必ずしも制限酵素部位を定義するものではなく、また必ずしも興味あるオリゴヌクレオチド配列を定義するものではない；および(2)核酸分析物中に存在する配列に相補的な領域のような標識された第2のポリヌクレオチド配列であり、該領域は第1のポリヌクレオチド配列の領域と同じ制限を受ける。二本鎖を形成する領域の少なくとも1つは、興味ある配列を定義する。制限酵素部位を定義する領域の1つが存在しない場合、あるいは制限酵素部位の存在に加えて、第1または第2のポリヌクレオチド配列と共に選択可能な切断部位が存在する。

第3の場合（第2図Cを参照）には、分析物は支持体に結合され、そして使用する試薬は制限酵素部位を定義し得る興味あるオリゴヌクレオチド配列に相補的な領域を有する標識されたポリヌクレオチド配列である単一成分である。制限酵素部位および／または標識されたポリヌクレオチド配列上に存在する官能基は選択可能な切断部位として役に立つ。

第4の場合（第2図Dを参照）には、捕獲プローブが提供される。接捕獲アロープは、結合「Y」を介して固体支持体に結合したポリヌクレオチド鎖であり、その反対側の末端は核酸分析物中に存在する第1の配列に相補的である。標識された第2のポリヌクレオチド鎖を含有する標識プローブは、第1の配列とは異なり、かつ重複しない分析物中の第2の配列に相補的な領域を有する。第2図Dにおいて「Y」と示された結合は、支持体にプローブを結合させるあらゆる従来の手段を表わす。結合「X」は選択可能な切断部位、すなわちジスルフィド結合、過ヨウ素酸で切断可能な1,2-

ジオールなどのような化学的に切断可能な結合である。

核酸を含む試料は、二本鎖形成が相補的な配列間で起こるような条件下で、適当な試薬と混合される。得られた混合物は、興味あるオリゴヌクレオチド配列に対して少なくともヘテロ二本鎖の形成またはホミニ二本鎖の形成を起こすような所定の厳密な条件下で、ハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションが起こるのに充分な時間の後に、支持体を上清から分離して洗浄し、少なくとも実質的にすべての非特異的に結合した標識を遊離させる。次いで支持体に結合したオリゴヌクレオチドを1つまたはそれ以上の試薬で処理すると、少なくとも一方の鎖が切断され、支持体に結合した標識が遊離する。

二本鎖形成をもたらす試料中の特定の配列の存在に依存して、支持体に結合した標識の遊離が観察される。通常、標識の存在に対して上清培地を分析する様々なプロトコルを使用し得る。しかし、場合によっては支持体が測定される。上清から支

持体を物理的に分離することが必ずしも必要ではないプロトコルおよび試薬を使用し得る。

本発明の方法は、種々様々な場合におけるオリゴヌクレオチド配列、すなわちDNA またはRNA の検出に使用し得る。興味ある1つの重要な分野は、特定の宿主に感染し得る病原体、ウィルス、細菌、カビ、原生動物などの検出である。例えば、米国特許第4,358,535号を参照されたい。興味ある別の分野は、羊水穿刺に伴うような宿主のゲノムに存在する対立遺伝子、変異、または障害の検出；遺伝的カウンセリング；宿主の感受性または罹病性の決定；および細胞集団のモニターである。興味ある第3の分野は、転写のモニター、RNA ウィルスの検出、発現されないRNA による生物の識別などの理由によるRNA の存在の決定である。興味ある他の分野は、外来染色体DNA または組込まれたDNA の存在、DNA 配列の増幅、このような配列の維持のために改変された生物をモニターすることを包含する。これらは、例示とすることを意図されるものであるが、全体的に包含されるも

のではない。

生理学的な試料は、本発明の方法を用いる様々な目的から明らかのように、種々様々な起源から得ることができる。起源は、種々の生理学的な液体を包含する：排泄物（例えば、大便、痰、小便、唾液など）；血漿、血液、血清、目の水晶体液、脊髄液、リンパ液など。試料は、改変することなく使用するか、あるいは試料をクローニングなどで増加させることにより改変し、単離を与え得る。後者の場合には、DNA またはRNA の全体の増幅、および外来のRNA またはDNA の減少が起こる。ウイルスは、ウイルスDNA の量が増加するように、適合可能な細胞の層の上に播種することができる；臨床上の単離物は、試料を栄養寒天培地上に塗布するかまたはスポットし、個々のコロニーを分析するか、あるいは試料全てを液体肉汁に導入し、細胞を選択的に、または非選択的に増加させることにより得ることができる。試料を処理する特定の方法は、試料の性質、DNA またはRNA の起源の性質、存在する核酸の親密度に対する、存在すると

予想される興味あるオリゴヌクレオチド配列の量、および使用されるプロトコルおよび標識の感度に依存する。

試料核酸または試薬ポリヌクレオチドは、共有結合的または非共有結合的、少なくとも非拡散的に、支持体に結合される。（第2図Dにより表わされる実施態様の場合には、捕獲プローブだけが固体支持体に結合される）。試料核酸が支持体に結合される場合、種々の支持体には特定の用途が見い出され、その程度までこれらの支持体は好ましい。これらの支持体は、ニトロセルロースフィルター、ジアゾ紙、エクテオラ紙(ecteola paper)、または他の支持体を包含する。他の支持体は、低い特異的結合または非特異的結合、核酸試料の保持、操作の簡単さ、および種々の適切な処理（例えば、生物の増殖、洗浄、加熱、移動、および標識の検出）を許容するような所望の特性を与える。

ポリヌクレオチド試薬の成分が支持体に結合されるという範囲まで、支持体の種類は、試料オリ

ゴヌクレオチドを伴う支持体の種類にわたって非常に多種多様である。支持体は、粒子、紙、プラスチックシート、容器壁、ディバイダー、ミリボアフィルターなどを包含する。支持体の材質は、天然に存在する有機高分子および合成された有機高分子の両方を包含する：多糖類、ポリスチレン、ポリアクリル酸、およびこれらの誘導体（例えば、ポリクリルアミド）、ガラス、セラミック、金属、炭素、ポリ塩化ビニル、ケンパクなど。これらの種々の材料は、共有結合または非共有結合のいずれが望まれるかに依存して、官能基化または非官能基化され得る。

試料核酸が支持体に結合される場合、特定の支持体に依存して、加熱は核酸を申し分なく結合させるのに充分であり得る。他の場合には、ジアゾ基を核酸に結合させるのに使用し得る。しかしながら、ポリヌクレオチド試薬の成分が支持体に結合される場合には、種々様々な技術がポリヌクレオチド試薬の支持体への結合の維持を確実にするために用いられ得る。例えば、支持体は、結合の

ための活性アミノ基を有するように官能基化することができる。この官能基化は、支持体へのアルキルアミン、ヒドラジン、またはチオセミカルバジドの結合により行なわれる。末端トランスフェラーゼを用いることによって、リポスクレオチドをDNAポリスクレオチド試薬に付加することができる。適当な酸化剤（例えば、過ヨウ素酸、過酸化水素に加えた酸化オスミウム、四酢酸鉛など）と共にグリコール開裂を行なうと、ジアルデヒドが形成され、次いで表面のアミノ基に結合し、一置換のアミノ基または二置換のアミノ基を与える。あるいは、チオホスフェートを使用するとアルキルチオエステルを形成するマレイミド基を与えることができる。アガロースおよびポリアクリルアミドに対して、Parikhら（前出）およびInman（前出）により述べられた種々の技術を使用し得る。これらの技術は、他の材料に対しても応用し得る。

分析培地に利用可能な支持体上のポリスクレオチド試薬成分の总数は、大部分が経験的に決定されるが、変更し得る。好ましくは、ポリスクレオ

チド密度がハイブリダイゼーションを妨害しない限り、支持体上の利用可能な官能基に対して、ポリスクレオチドの単位表面積当たりに、かなりの高濃度を用い得る。

（以下余白）

ポリスクレオチドの大きさは、広範囲に変化し、普通は約15塩基を下回らず、50塩基またはそれ以上であり、普通は約500塩基を越えず、より普通には250塩基を越えない。通常、核酸試料中の配列と相同性を有する、ポリスクレオチド試薬成分中の領域が存在し、通常興味ある該配列は、少なくとも5塩基、通常少なくとも12塩基を有する。ハイブリダイゼーションのための領域は、16塩基またはそれ以上であり、通常約1 kbpを越えない。完全な相同性は必要ではなく、少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも80%の相同性があれば充分である。（相同性の割合（%）は相補性を表すことを意図する。ただし、環状に突出している5塩基より大きな非相補的挿入部分は無視する。）特に、対立遺伝子群、数多くの異なる株、または関連のある種（mRNAやゲノム部分は良く保存されるが、それにもかかわらず多くの形態をとる）に興味がある場合には、しばしば、その相違を反映し、いかなる特定の配列に対しても興味あるすべての配列に対する相同性を最適化するプローブ

の調製が望まれる。

標識されたポリスクレオチド試薬成分の標識は、選択性に切断可能な部位または分析中に保持される架橋により、ポリスクレオチド配列に加えられ得る。種々様々な標識を使用し得る。該標識は検出可能な信号または検出可能な信号を得るための手段を提供し得る。

従って、標識は、配位子、放射性同位元素、酵素、蛍光体、化学発光体、酵素自己不活化抑制剤、酵素共同因子、酵素基質などの種々の置換基、あるいは直接的または間接的に検出可能な信号を与える他の置換基を包含する。

配位子が含まれる場合には、通常、該配位子に特異的に結合する受容体、例えばビオチンおよびアビシン、2,4-ジニトロベンゼンおよび抗(2,4-ジニトロベンゼン) IgGなどが使用される。該受容体は、上述のように、適当な標識で置換される。このようにして、ポリスクレオチド配列1つあたりに1個の検出可能な信号を与える標識の数を増加させ得る。

大部分は、免疫分析法で使用するために用いられる標識は、本発明の分析に使用し得る。これらの標識は、米国特許第3,850,752号(酵素)；第3,853,914号(スピニン標識)；第4,160,016号(蛍光体)；第4,174,384号(蛍光体および消光剤)；第4,160,645号(触媒)；第4,277,437号(化学発光体)；第4,318,707号(消光粒子)；および第4,318,890号(酵素基質)に例示されている。

例示となる蛍光標識および化学発光標識は、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、ウンベリフェロン、ビリプロテイン、ルミノールなどを包含する。

例示となる興味ある酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースー6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -アミラーゼ、ウリカーゼ、マレートデヒドロゲナーゼなどを包含する。すなわち、興味ある酵素は、主に加水分解酵素および酸化還元酵素である。

標識をポリスクリオチド配列に結合させる方法

は、該標識の性質に依存して、広範囲に変化する。すでに指摘したように、リボスクリオチドは、オリゴスクリオチド配列に付加され、切断され、そして得られたジアルデヒドはアミノ基またはヒドラジン基に結合される。この結合の永続性は、アルキルアミンの形成をもたらす還元条件を用いるとにより、さらに向上する。あるいは、これら標識は、マークロモまたはマークロロアセチルのような活性ハロゲンと置換され得る。活性ハロゲンは、チオリン酸基またはチオブリンに結合され、チオエーテルを形成する。あるいは、これら標識はマレイミド官能性を有し得る。この場合、ポリスクリオチド上に存在するメルカプト基はチオエーテルを形成する。ポリスクリオチドの末端リソ酸は、カルボジイミドで活性化され得る。この場合、得られたホスホイミダゾリドは、アミノ基またはアルコールと反応し、ホスホアミデートまたはホスフェートエステルとなる。ポリペプチド結合は、アミノ修飾されたブリンに形成され得る。このように、標識の選択、結合の方法、および結

合基の選択には、大きな自由度がある。

ポリスクリオチド試薬を試料と結合させることにより、存在する核酸分析物は支持体と結合するようになる。選択的に切断可能な部位における切断により支持体から放出される標識の量は、分析物の存在に關係し、該分析物の量は定量的に決定され得る。

標識と支持体との間の空間的な關係の改変は、数多くの方法で達成され得る。指摘したように、プローブおよび同じポリスクリオチドに共通する少なくとも1つの認識部位が存在し得る。該部位は制限酵素で切断され、従って支持体からプローブが放出される。種々様々な制限酵素は、4塩基、6塩基、または8塩基の認識部位を検出するに利用可能である。認識部位における、または認識部位から離れた箇所における切断は、平滑末端または付着末端を与える。このようにして、認識部位の二本鎖形成は、標識の放出を伴って二本鎖が開裂する機会を与える。

選択的に切断可能な部位の性質は、必ずしも結

合基に依存しない。制限部位を含む場合、試薬成分に含まれる結合は、分析条件下で安定であることだけが必要である。制限部位を含まない場合、部位は支持体から標識を分離させる結合を含む。

無秩序な加水分解が支持体から標識を分離するホスホジエステラーゼを使用し得る。ポリスクリオチドは、引き続いて標識されるか、または標識され得る改変スクリオチドに連結され得る。

スクリオチドが標識の結合に対して改変されるか、または改変されない種々様々な結合基を使用し得る。WO83/02277には、 β -アミノアルキルアデノシンの使用が報告されている。この場合、標識はアミノ基に結合し得る。次いで、DNAポリスクリオチド試薬は、複数の標識が各標識されたポリスクリオチドの末端に存在するように、リボスクリオチドを連結し得る。連結されたりボスクリオチドは、RNaseを使用して選択的に切断され得る。これは、信号を改変するような相互作用をする標識を使用する場合に、特に有利である。例えば、極めて接近した蛍光体は自己消光する傾向が

ある。観察される蛍光体信号は、リン酸結合の加水分解によって非常に促進されるので、個々の蛍光体分子は溶液中に無秩序に存在する。もちろん、蛍光体はこの現象を示す唯一の標識である必要はない。他の標識体も同様の効果を示し得る。酵素基質または共同因子を用いる場合には、支持体に結合するポリマー上に、それらが存在することにより、酵素の接近に伴う実質的な立体障害が起こる。従って、標識体の解重合および支持体からの放出は酵素反応速度を実質的に増大させる。

別の技術は、DNAポリヌクレオチド試薬にリポスクレオチドを付加し、次いでリボース部分を開裂させて、ジアルデヒドを生成させることである。(例えば、Leeら、*Biochemistry*(1970)9:113-118を参照されたい)。ジアルデヒドは、選択的に切断可能な部位により標識に結合するアミノ基に連結され得る。例えば、ジスルフィド結合は、シップ塩基と、還元により切断される標識との間に存在し、エルマン試薬などにより標識を放出し得る。制限エンドヌクレアーゼを用いて標識を放出させ

ヌクレオチドの化学合成を包含する。該化学合成の後には、フルオレセンまたはジニトロベンゼンのようなリポーター基の導入が行われる(Ruth、*DNA*(1984)3:123)。

検出可能な信号を直接与えないが、1つまたはそれ以上の標識と複合体を形成するリポーターに結合するような配位子で置換されたヌクレオチドを使用し得る。具体例としては、アビジンに結合するビオチニル化ヌクレオチド、免疫グロブリンに結合するハプテン、およびタンパク受容体(例えば、レクチンを伴った糖、細胞表面の膜タンパクを伴ったホルモンおよび成長因子など)に結合する種々の天然に存在する化合物が挙げられる。

第2図Dにより表される実施態様では、選択可能な切断部位は、2つの方法のうちの一方で導入される。

まず、架橋化合物は、捕獲プローブ1それ自身、すなわち図中に示されている「X」の位置に取り込まれる。いかなる数の架橋剤も、この目的のために使用される。唯一の制限は、該捕獲プローブ

の場合には、ジアルデヒドは、還元アミノ化条件下でアミノ官能基と結合し得る。タンパク(例えば、酵素の)のような種々のアミノ源、フィコビリプロテイン蛍光体、免疫グロブリンやアビジンのような受容体、またはタンパク標識を使用し得る。

別の結合方法は、カルボジイミドを用いて末端のリン酸を活性化し、ホスホイミダゾリドを形成することを包含する(Chuら、*Nucleic Acids Res.*(1983)11:6513-6628)。ホスホイミダゾリドは、アミンと反応して、ホスホアミデートを形成する。前述のように、アミノ結合基は、選択可能な切断部位を適当に含む。該部位は、ピロホスファターゼにより開裂し得るピロホスフェートジエステル、ペプチダーゼにより開裂し得る短いポリペプチド、光感性官能基(例えば、アゾ、ペルオキシなど)であり得る。

標識を付着する別の方法は、12原子のアミンリンクアームを含むシトシンまたはウラシルのような改変可能なヌクレオシド誘導体を用いたポリ

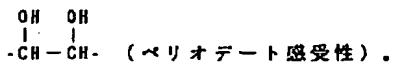
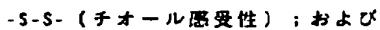
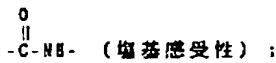
中に導入された切断部位が、この方法の残りの部分で使用される種々のプローブ、標識などと適合する試薬を用いて開裂しなければならないことである。適切な架橋剤の例を以下に示す：

プローブ中にアミド結合を導入するN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)；ヒドロキシルアミン感受性架橋を形成するエチレンギリコール-ビス(スクシンイミジルスクシネット)(EGS)；塩基感受性スルホン架橋を与えるビス[2-スクシンイミド-オキシカルボニルオキシ]エチルスルホン(BSOCOBS)；過ヨウ素酸により開裂し得る1,2-ジオールを導入するジスクシンイミジルタルクレート(DST)；そしてチオールで開裂可能なジスルフィド結合を与えるジチオビス(スクシンイミジルプロピオン酸)(DSP)である。架橋剤は、好ましくは以下の方法によって捕獲プローブ中に導入される：アルキレンアミンプローブの調製(Urdeaら、*Nucleic Acids Research* 16(11):4937-4956(1988))；(2)プローブ結合架橋剤を与える。選択された架橋剤によるプローブ上の遊離アミン官

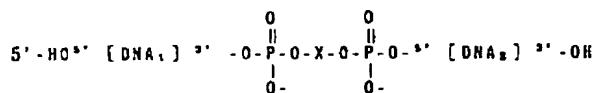
能基の反応：(3) クロマトグラフィーまたは他の方法を用いたプローブ結合架橋剤の精製；そして(4) 所望の切断部位を有する支持体結合プローブを与える、プローブ結合架橋剤の、遊離反応部分（例えば、遊離アミン基）を有する固定支持体との反応。

(以下余白)

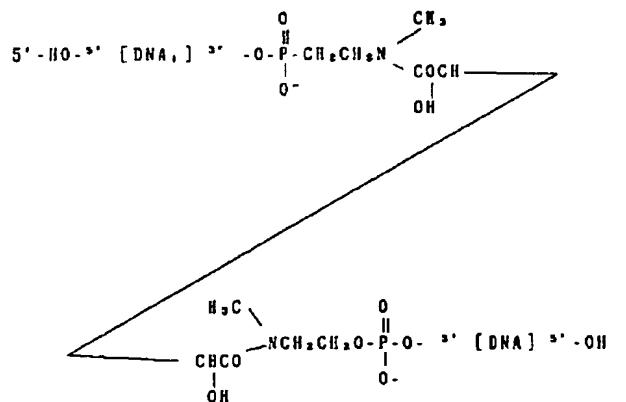
それ故、切断部位は、例えば次の結合の型を包含し得る：



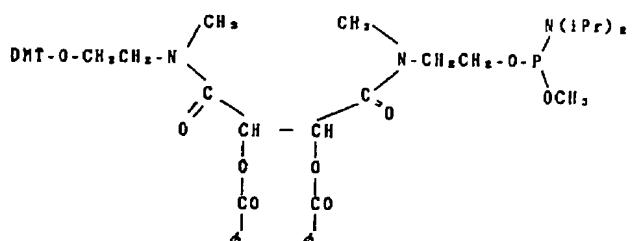
第2図Dにおける選択可能な切断部位「X」はまた、固体支持体への結合の前に、捕獲プローブの適当な改変により導入され得る。この方法は、次の構造を有するポリヌクレオチドの調製を包含する：



ここで、Xは、上記の選択可能な切断部位であるか、あるいはこれらの切断部位を含む。特に好適な実施態様では、ポリヌクレオチドは次の構造を有する：



次いで、この化合物は、当該分野でよく知られた従来の方法を用いて固体支持体に付着され、第2図Dに示された捕獲プローブを与える。後者の化合物は、酒石酸から誘導された試薬を用いて調製される。この場合、1,2-ジオール系は、DNAの合成の間にジベンゾイル化合物として保護され、さらにジメトキシトリチル(DMT)で保護された水酸基と、ホスホアミダイト由來の水酸基（ここで、「iPr」はイソプロピルを表す）とを含んでいる。



これらの水酸基は標準的なホスホアミダイト法用いてDNA断片に結合される。合成および完全な

脱保護化の後、DNA/DNAハイブリッドは、上記のように、1,2-ジオール、すなわちNaIO₄で特異的に開裂され得る結合を含んでいる。当業者により容易に認められているように、DMT保護基は、酸感受性でありかつ塩基安定性であるような適当な部分R'（例えば、非置換または置換のアリール基またはアルキル基）で置換され得る。ここで、アルキル基は、例えばフェニル、ナフチル、フラン、ビフェニルなどであり、これらの置換基は0～3個、通常は0～2個である。R'は、非干渉の安定な基（中性または極性の基、電子供与性または電子吸引性の基）を包含する。同様に、ホスホアミド部分は、ポリヌクレオチド合成に適したリン誘導体（例えば、ホスホトリエステル、ホスホジエステル、ホスファイト、H-ホスホネート、ホスホロチオエートなど）を包含する別の種のR'、あるいはハロゲンで置換され得る。例えば、特開昭62-188970号（Urdeaら、「溶液相核酸サンドウイッチ分析および該分析に有用なポリヌクレオチドプローブ」）を参照されたい。

とが必要である。

オリゴヌクレオチド鎖の非拡散性結合のための種々様々な支持体および技術は文献に報告されている。総説としては、HeinkelおよびWahlのAnal. Biochem. (1984) 138:267-284を参照されたい。80℃の温度で2時間加温するだけで充分な支持体には、ニトロセルロースフィルタがあり、さらに活性化を行わなくても結合が起こる支持体にはジアゾ紙があり、その他の支持体にはエクテオラ紙などがある。アガロースビーズは、DNAとの直接反応のために臭化シアンで活性化され得る（Bannoら、J. Histochem. Cytochem. (1981) 29:227-237）あるいは、ポリヌクレオチド鎖に存在するチオール官能基と反応し得るビーズを提供するために、臭化シアンおよびジアミンと反応させ、次いでα-ハロアセチル（例えば、プロモアセチル）と、または活性カルボキシル置換オレフィン（例えば、無水マレイン酸）と、反応させ得る。例えば、DNAは、改変して、結合のためのα-チオホスフェートを形成し得る（PfeufferおよびBilimreich、上

第2図A～Cによって示された実施態様におけるように、第2図Dの実施態様は、溶液中の特異的結合標識の検出（および、分析物2の正確な測定）を可能にする。この場合、非特異的結合標識6は固体支持体5に結合したままである。

第3図AおよびBによって示された本発明の他の実施態様では、捕獲プローブ1（結合Yにより固体支持体5に結合している）と、核酸分析物2と、標識プローブ3との間で、複合体が、第2図の実施態様におけるように、形成される。このハイブリッド複合体を得る方法は、上で引用した特開昭62-188970号にさらに詳細に記載されている。特異的に結合した標識を溶液中へ放出させるために、「置換」ポリヌクレオチド鎖4が導入され、分析物と捕獲プローブとが形成するハイブリッドよりも安定なハイブリッドを捕獲プローブ1と形成するように選択される。G/C含量もまた、1つの要素であるが、この方法では、典型的に、置換鎖の長さ「B」が捕獲プローブと分析物との間で形成された二本鎖の長さ「A」よりも若干長いこ

Biol. Chem. (1975) 250:867-876）。化学的手段によって、テフロン支持体に結合したオリゴヌクレオチドを合成し、次いでそれを除去することなく、該物品を充分に脱保護化することも可能である（Loehrmanら、DNA (1984) 3:122）。

標識および試薬の多種多様性を考慮して、本発明の方法における共通の局面が述べられ、次いで2、3の例示的なプロトコルが述べられている。これらの手順に共通する部分はハイブリダイゼーションである。ハイブリダイゼーションは、様々な程度の厳密さで実行され得る。従って、より高いあるいはより低い相同意性が二本鎖の形成に必要とされる。大部分の場合、水溶性媒質が用いられる、それは様々な他の成分の混合物を有し得る。特に、有機極性溶媒は厳密さを高めるために用いられる。溶媒の例としては、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシドなどが挙げられる。すなわち、使用量では、水と混和し得る有機溶媒が用いられる。厳密さはまた、塩濃度を増大することによっても高められ、大きなイ

オン強度が得られる。また、温度を上昇させることも、厳密に使用され得る。各場合には、逆のことを行えば、厳密さは減少する。他の添加剤（例えば、界面活性剤）もまた、厳密さを限定するために使用され得る。

ハイブリダイゼーションの時間は、興味ある配列の濃度、厳密さ、相補配列の長さなどにより様々である。通常、ハイブリダイゼーションは、少なくとも約15分、一般的には約72時間またはそれ以内、より普通には約24時間またはそれ以内で行われる。さらに、ある厳密さでハイブリダイゼーションを行い、次いでより高い厳密さで洗浄することにより、充分な相同性を欠くヘテロ二本鎖が除去される。

核酸試料は、様々な方法で処理される。この場合、完全なゲノム、機械的に剪断されるか、または制限酵素で分解された0.5kb～30kbの様々なサイズのゲノム断片、あるいは例えば電気泳動によりサイズで分離された断片を使用し得る。場合によっては、興味ある配列は、例えば一本鎖DNAま

たはRNAウイルス（例えば、H13）のような適当なベクター内でクローン化された配列である。

分析媒体中に含有されるのは、緩衝液、界面活性剤（例えば、SDS）フィコール、ポリビニルピロリドンを包含する他の添加剤と、外来DNAであり、それらは非特異的結合を最小にする。これらの添加剤のすべては、文献中に例が挙げられているので、ここでは詳しく述べる必要はない。

特定のプロトコルに従って、試料核酸およびポリスクレオチド試薬は、所定の厳密さのハイブリダイゼーション媒体中で混合される。充分な時間にわたってハイブリダイゼーションを行った後、支持体は、ハイブリダイゼーション媒体よりも厳しいあるいは緩やかな厳密さの媒体で、少なくとも1度洗浄される。結合したポリスクレオチドおよび分析物を有する支持体は、次いで選択可能な切断部位を切断するために必要な反応物（物理的処理、例えば光を包含する）と接触させ、一本鎖または二本鎖の開裂を行なう。大部分の場合、加水分解酵素（例えば、制限エンドヌクレアーゼ、

ホスホジエステラーゼ、ビロホスファターゼ、ペプチダーゼ、エステラーゼなど）が使用される。しかし、還元剤、エルマン試薬、または光のような他の試薬にも有用性が見られる。切断後、標識および測定方法に依存して、支持体および上清は必ずしも分離されず、該支持体から放出された標識の量が測定される。

さらに本発明を例示するために、2、3の例示的なプロトコルが述べられる。第1の例示的なプロトコルでは、マイクロタイターブレートが使用される。この場合、蛍光標識されたポリスクレオチドは、各ウェルの底に結合する。クローン化されている病原体由来のDNAは、約0.5kb～2kbの断片を与えるために、1つまたはそれ以上の制限酵素で制限される。断片は、変性させるための緩やかな塩基性の条件下で単離され、ハイブリダイゼーション媒体中に分散される。次いで、これら断片は、様々なウェルに順番に加えられる。各ウェルは、様々な配列を有しており、これらの配列は、特定の病原体種の様々な株の配列と特異的な

相同性を有する。

これらのウェルは、高温（例えば、60°C）で、ハイブリダイゼーションが起こるのに充分な時間にわたって保持される。その後、上清は除去され、ウェルはハイブリダイゼーション媒体よりも低い厳密さの緩衝化媒体で繰り返し充分に洗浄される。二本鎖を形成することによりすべての株に共通する制限酵素の認識部位が得られる。次いで、各ウェルには、二本鎖DNAを分解するための制限酵素媒体が添加され、分解の結果、蛍光標識は上清中に放出される。上清は、各ウェルから吸い出され、照射される。次いで、蛍光の量は、興味ある配列の存在の指標として測定される。このようにして、液相中の蛍光の存在を観察することによって、株が存在するものを迅速にスクリーニングし得る。

第2の例示的なプロトコルでは、標識されていないポリスクレオチドが結合したガラスピーブーズを含むカラムを使用する。次いで、このカラムに、哺乳動物細胞から得られたDNA断片を含有する試料核酸を加える。これらの断片は約0.5kb～10kb

までの範囲に及ぶ。DNA試料は、適当なハイブリダイゼーション媒体中に分散され、そしてカラムに加えられ、ハイブリダイゼーションが起こるのに充分な時間にわたってカラム中に保持される。試料のハイブリダイゼーションの後、ハイブリダイゼーション媒体は、カラムから放出され、ジスルフィド結合により西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) で標識されたポリヌクレオチド試薬は、第1の媒体よりも厳密な条件下で、第2のハイブリダイゼーション媒体中に加えられる。第2の媒体は、ハイブリダイゼーションが起こるのに充分な時間にわたってカラム中に保持される。標識されたポリヌクレオチドは、興味ある配列に相補的な配列を有する。ハイブリダイゼーション媒体はカラムから減圧により除去される。

標識されたポリヌクレオチドと不充分な相同性しか有さないポリヌクレオチド配列を除去するために、カラムはより高い厳密さの溶液で、1度またはそれ以上、洗浄され得る。次いで、エルマン試薬がカラムに加えられ、ジスルフィド結合が切

断され、そして HRPが放出される。この HRPを含んでいる溶液は、カラムから減圧により除去され、集められる。さらに、遊離の酵素がカラム中に保持されないことを確実にするために、洗浄を行なう。得られた HRP標識含有溶液は、ここで HRP標識について分析される。 HRPに代えて、種々様々な他の酵素が使用され得る。これらの酵素は、分光光度または蛍光光度により検出可能な生成物を与える。

(以下余白)

第3の方法においては、核酸のサンプルをフィルターに吸収させ、80°C 2時間加熱することにより、ニトロセルロースフィルターの一方の端に非拡散的に結合させる。フィルターを洗浄し、それからハイブリダイゼーション条件下の下で、アルキルカルボキシ置換アデニンにエストル結合したウンベリフェロンで標識したポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション溶液に添加する。標識したポリヌクレオチドは、目的の塩基配列に相補性のある配列を有する。充分な時間でハイブリダイゼーションを行った後、フィルターをハイブリダイゼーション溶液から取り出し、非特異的に結合した核酸を除くために洗浄し、そして、計量したエステラーゼ溶液中に浸す。螢光量の増加の割合を核酸サンプル中における分析物の量として測定し、モニターする。

また別の方法においては、プラスチック材料製のディップスティック (dipstick) が用いられる。このディップスティックにおいては、ジストリップ (末端に螢光物質を有し、分析物の配列に相補

性のある、標識ポリヌクレオチド配列を有する) を支持するホルダーが用いられる。核酸サンプルは適当なハイブリダイゼーション媒質内で調製されディップスティックが導入され、そして、ハイブリダイゼーションが行われる。十分な時間でハイブリダイゼーションを行った後、ディップスティックを除き、全ての非特異的結合ポリヌクレオチドを除くために洗浄する。目的とするポリヌクレオチド配列の存在により、制限酵素認識部位が形成され、そして、ディップスティックが制限酵素反応混合物に入れられ、分解が行われる。充分な時間分解した後、ディップスティックを除き、充分に洗浄し、溶液の螢光量を測定する。ベースラインを上回る螢光量は、分析物の存在を示す。

また別の方法においては、ポリヌクレオチド試薬成分は、核酸分析物のある領域に相補性のある配列を持ち、かつ、マイクロタイターブレートのウェルの壁に結合する第1のポリヌクレオチド、および核酸分析物の別の領域に相補性のある第2の標識ポリヌクレオチドである。標識は、N⁶-ア

ミノヘキシルデオキシアデノシントリホスフェート ウンベリフェリカルボキシアミドでボリヌクレオチドの尾部分に行なう。核酸サイブルをハイブリダイゼーション条件下で、過剰の標識ボリヌクレオチドの入ったウェルの中に導入する。充分な時間でハイブリダイゼーションを行なった後、ハイブリダイゼーション溶液をウェルからアスピレーターで取り除き、ウェルを洗浄し、ウェル内に残ったDNAを脱ブリン化する。この脱ブリン化は、90% ギ酸を加え、60℃にて時間加熱するか、あるいはビペリジンを加え90℃にて30分間加熱することにより行われる。

あるいは、標識を、螢光物質N⁻:エテノアデノシンをつくるSilverおよびFeishの方法(Biochemistry(1982)21:6066)によりポリdAをクロロアセトアルデヒド処理することによって得られるオリゴマーの過剰量で標識したボリヌクレオチドを連結させることにより行なう。標識の除去は、ミクロコッカスのスクレアーゼを用いて、100 μgM CaCl₂中で37℃にて1時間にわたり行なうことにより達成

される。

両方の場合において、ポリマーの螢光は自己消光のために実質的に減少する。溶解により、螢光量の実質的な増加が見られる。このように、脱重合抵抗性を示す非特異的結合標識ボリヌクレオチドは、検出可能なシグナルの妨げとはならない。さらに、核酸分析物を定量するために螢光量増加の割合を測定することができる。なぜなら、バックグラウンドの螢光レベルは弱いからである。自己消光の代わりに、螢光物質と消光物質のどちらか、あるいは、その両方の成分の試薬系を用いることも可能である。このような系においては、1つの成分中には非消光螢光物質が存在し、消光物質は、もう一方の成分中に存在する。

次の実施例は、本発明を説明するものであり、制限するものではない。

(以下余白)

実施例

I. リボヌクレオチドのDNAの3'末端への結合 a. ターミナルデオキシヌクレオチドトランスクレラーゼ(TdT)による尾部伸長

次に述べるのは、R.Roychoudry, Method in Enzymology(1980)65:43 の方法に修正を加えたものである。合成したATTCGACGGCTTATCG (5' → 3')である断片1の末端にrATPを付加した。15 μlの0.83mM ATP、および2.5 μlの10×TdT緩衝液(1.4Mカコジル酸カリウム、0.6MトリスpH7.6、10mM CoCl₂、1mMジチオトレイトール(DTT))の溶液中の4005ピコモル(20 OD₂₆₀単位を1mgとする)の断片1に、2 μlのTdT(仔ウシの胸腺由来、P-L Biochemicals, Inc.:13.5単位)を加える。24.5 μlのサンプルを、37℃で1時間放置後、エバボレーションにより乾燥させた。ペレットを10 μlの90%ホルムアミド、0.05%プロモフェノールブルー、1%フィコールに溶解させ、90℃にて5分間加温した。次に、20%の変性ポリアクリアミドゲル上にのせ、40ミリアンペアで流した。

リボアデノシン1単位によって伸長させた断片1に相当するバンドをU.V.照射によって確認し、ゲルから切り出し、0.1Mトリス、pH8.0、5 mM EDTA、0.5M NaCl中に1晩かけて溶出させた。(Maxam and Gilbert, Methods in Enzymology(1980)65:499-560)。C-10 SEP-PAK(Waters Associates)による脱塩は次のようにして行った。まず、カートリッジを5 mlの試薬グレードのメタノールで、次いで10mlの蒸留水で洗浄した。次に、濾過したサンプルをSEP-PAKに注射器で注入した。20mlの水で洗浄後、DNAを3 mlの酢酸トリエチルアミン(pH7.3):メタノール(体積比1:1)で溶出させた。次に、エバボレーションにより乾燥させた(収率約80%)。

b. T.リガーゼによるライゲーション(連結)
次に述べられている方法は、3'末端にリボアデノシンを含む137ベースの断片を合成するのに用いられた。上記にて合成された断片1は、共通に適合し得るアダプターとして、ライゲーションにより、末端にリボヌクレオチドのついたDNA配列

を合成するのに用いられる。

断片 2

AGTTGGCACTACAGCCTAGCAGCCATGGAAACGATGTATATTTC
CGCCGAGAGGACGACAG

断片 3

GGTCGTCCGGGGATTCAAGCGCCGACGGGACCTAAACAAAGGAC
GTCCCCGGAAAGGATCC

断片 4

TTCCATGGCTGCTAGGCTGTACTGCCAAGTGGATCCTTCCGGG
ACGTCCTTGTTCAGC

断片 5

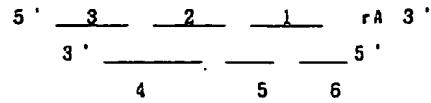
AATTCTGTCGGTCCCTCTCGCG

断片 6

CCATAAGGGTCCG

特に指示のない限り、上に示した塩基配列の 5' および 3' 末端は水酸基である。これらの配列は、次のように連結され得る。

(以下余白)



1) ライゲーション

2) ゲルによる単離

断片 2 を、T₄ ポリヌクレオチドキナーゼにより、リン酸化した。あらかじめエバボレートして乾燥した 900 ピコモルの断片に、2 μl の 10×KB-TS (500mM トリス、100 mM MgCl₂、10 μg / μl スペルミジン) と、2 μl の 10mM ATP と、2 μl の 10mM DTT と、1 μl (8 ユニット) の T₄ キナーゼ (New England Nuclear) と、13 μl の水とを加えた。37 °C で 30 分間保温した後、さらに 8 ユニットの T₄ キナーゼを加えた。さらに 37 °C にて 30 分間保温した後、同様の方法によりすでに 5' 位をリン酸化した 45 μl (990 ピコモル) の断片 1 を加えた。22 μl の 2 M 酢酸ナトリウムと 8 μl の 250mM EDTA とを加えた後、T₄ キナーゼを不活性化するために、溶液を 65 °C で 5 分間加熱した。次に、断片 3 ~ 6 を加えた (それぞれ 2.6 μl、902 ピコモル

ル : 8 μl、1008 ピコモル ; 32 μl、1003 ピコモル 45 μl、936 ピコモル)。この溶液をポルテックスにかけ、680 μl の冷エタノールを加え、-80 °C で 20 分間放置する。次にペレットを 12800 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みをゆっくり捨て、冷エタノールで 2 回洗浄し、乾燥させる。

これらのものをアニールさせるため、18 μl の水を加え、加熱を行ってペレットを溶かした。加熱を行った混合物の加熱は沸騰水浴中で行い、室温までゆっくりと冷却した (約 10 分間)。ここで、3 μl の 10×KB-TS と、3 μl の 10mM ATP と、3 μl の T₄ リガーゼ (New England Biolabs; 40000 単位 / μl) とを加えた。14 °C で 30 分間放置した後、溶液を乾燥させ、(断片 1 について上述したように) 10% の変性ポリアクリルアミドゲルで精製した (収量: 約 75 ピコモル)。

c. 2'-ニトロベンジルウリジン コントロールポアガラス支持体上でのDNAの合成

コントロールポアガラスの 5'-ジメトキシトリチル 2'-ニトロベンジンウリジン誘導体 (長鎖ア

ルキルアミノ ; は Pierce Chemical Company) は、Gouglia, Tetrahedron Lett. (1981) 22:4177 の方法により、Cruachem, Bend Oregon により調製された。オリゴヌクレオチドの合成は、自動合成装置 (Warner ら, DNA 3 印刷中) により行った。

2'-ニトロベンジル官能基は、2100 ワットの水銀ランプを使用したこと以外は、Ontsuka ら, Nucleic Acids Res (1974) 1 : 1351 に記載されたようにして UV 照射により取除した。全てのサンプル (約 14.5 μl モルの 2'-ニトロベンジルウリジン) について、5 分間の照射は、バイレックスのキュベットで行った。

この方法により、5' TTCCATGGCTGCTAGGCTGTAC TGCCAACTGGATCCTTCCGGGACGTCCTTGTACGrU 3' に相当する配列 (断片 7) を合成し、下記に述べられている結合に用いた。

II. DNA 3' 末端の固体支持体への結合

a. チオセミカルバジド コントロールポアグラス (TSC-CPG) の合成

イソチオシアネート コントロールポアグラス

(Pierce Chemical) をヒドラジンにより次のように修飾し、チオセミカルバジト誘導体を生成させた。400 mgのイソチアシアネートCPGを50 mlの丸底フラスコに入れた。25 mlのジメチルスルホキシドと、200 μ lの蒸留ビリジンと、ジメチルスルホキシド中に溶解させた0.6%のヒドラジン500 μ lを加えた(例えば、J. Baumanら、J. Histochem. and Cytochem. (1981) 29 : 227を参照されたい)。時おり攪拌しながら暗所で18時間放置した後、ジメチルスルホキシド、ビリジンおよびメタノールのそれぞれ50 μ lずつ、そして、0.01M、pH 7.5のトリス2 mlで洗浄した。

b. 固体支持体への断片7の結合

約2000ピコモルの断片7をエバボレーションにより水を除去して乾燥させた。これに、100 μ Ciの $\gamma^{32}P$ -ATP(New England Nuclear)と、2 μ lの10×KB(0.5Mトリス塩酸pH7.8, 100mM MgCl₂, 100mM DDT)と、1 μ l(8ユニット)のT.キナーゼ(New England Nuclear)とを加えた。37°Cで30分間保温したあと、その溶液をゲル抽出緩衝液で1度に稀

釈し、上述のように、SEP-PAK脱塩を行った。断片7(20 μ g, 982ピコモル)に、0.01Mトリス塩酸(pH 8.0)中の1 mM過ヨウ素酸ナトリウム(Sigma)20 μ lを加え、暗所で0°Cにて1時間保持した。これに、0.1M酢酸ナトリウム(pH5.6)100 μ l中のTSC-CPG 10mgを加え、混合物を暗所で0°Cにて1時間保持し、4°Cにて一夜放置した。

残存するチオセミカルバジト官能基をブロックするために、過ヨウ素酸で酸化したATPが用いられた。100 mM ATPの20 μ lのサンプルを、100 μ lの0.01Mトリス塩酸(pH8.0)中の20mgの過ヨウ素酸により処理した。暗所で1時間放置した後、この溶液45 μ lを、0.1M酢酸ナトリウム150 μ l中の断片7-TSC-CPG 10mgに加えた。4°Cで6時間放置後、この支持体を4×標準クエン酸ナトリウム(SSC)溶液で充分に洗浄した。

取り込まれたカント数に基づくと、断片7の13%(128ピコモル)が、ガラス支持体に結合した。

III. DNAの5'末端の固体支持体への結合

a. プロモアセチル コントロールポアガラス

(BA-CPG)の調製

0-プロモアセチル N-ヒドロキシスクシミドの合成は、Cuatrecasas、J. Biol. Chem. (1974) 245:3059の方法にほぼ基づいて行った。

347 mgの臭化酢酸と、345 mgのN-ヒドロキシスクシミド(Sigma)との混合物を、20 μ lの蒸留ジオキサン中での混合物を調製した。この混合物に、532 mgのジシクロヘキシルカルボジミドを加えた。室温で70分間振とうした後、混濁した溶液をグラスウェルにより滤過した。

500 mgの長鎖アルカリアミノコントロールポアガラス(Pierce Chemical: 0.1meq/g)に、10 mlの0.1M酢酸ナトリウム(pH7.6)を加えた。このスラリーを水上に置き、0-プロモアシル N-ヒドロキシスクシミド溶液をゆっくりと加えた。30分間、時おり攪拌した後、BA-CPGを5 mlの0.1M NaClで洗浄した。

支持体上の臭化酢酸の当量数は、5', 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)テスト(Butterworthら、Arch. Biol. Biophys. (1967) 118:

716)の方法により決定した。50 mlの水に溶解させた200 mgのDTNBと、100 mlの水に溶解させた2-メルカプトエチルアミン114 mgとを含有するストック溶液を調製した。BA-CPG(10 mg)を、10 μ lの2-メルカプトエチルアミン溶液に0.05Mのリン酸ナトリウム500 μ l(pH8.0)を加えたものと、10分間室温で反応させた。次に、その溶液を100 μ lのDTNBにより試験し可視スペクトルで記録した($E = 1.36 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pH 8)。BA-CPGなしで2-メルカプトエチルアミンを用いたものをコントロールとした。BA-CPG処理によって失われた2-メルカプトエチルアミンの量から、BA-CPGが10 mol/mgの臭化酢酸を含んでいることが決定された。

b. DNA 5'末端のBA-CPGへの結合

10 μ g(333ピコモル)の断片3(上記参照)に、10 μ lの3-³²S-ATP(アデノシン5'-O-(3-チオトリリン酸; 0.25mCi, New England Nuclear))と、2~5 μ lの10×KBと、1 μ l(8ユニット)のT.ポリヌクレオチドキナーゼを加えた。37°C

で30分間保温し、 $1 \mu\text{L}$ の 50mM 3'-S-ATP (リチウム塩、P-L Biochemicals)、および $1 \mu\text{L}$ (8U) のT₄ キナーゼを添加した。さらに 37°C で30分間保温し、断片を上述したようにゲルにより分離した。(収量: 266 ピコモル)。サンプルを Beckman LS7000 液体シンチレーションカウンター Atomite (New England Nuclear) によりカウントした。

BA-CPG の $5 \mu\text{L}$ のサンプルを水により3回、 0.10M 、pH7.6 のリン酸ナトリウム溶液で2回遠心分離にかけることにより洗浄した。 $5'$ -チオリン酸断片2を $100 \mu\text{L}$ のリン酸緩衝液に溶かし、洗浄した BA-CPG に加えた。スラリーは、ロータリーエバボレーターを回転させることにより2時間室温で攪拌した。溶液はデカンテーションにより廃棄した。残留する臭化酢酸官能基をブロックするため、支持体を $200 \mu\text{L}$ の 50mM リン酸ナトリウム(pH8.0)と、 $50 \mu\text{L}$ の2-メルカプトエタノールとによってさらに2時間処理した。続いて、溶液のデカンテーションを行い、支持体を $4 \times$ SSC により充分に洗浄した(収量: CPG 1 mg当たり約10ピコモル)。

した)。 $5'$ 位を ^{32}P -リン酸で標識した断片8を用いて対照実験を行なうと、これらの条件下で0.5%を下まわるカウントが溶出した

b. ゲルによる分離

断片9 ($5'$ -TTGAAGAACTACGGTTTGTCTTGTTCA GAAAGGACTTGCACAAGACCCAAACC-3') のペルオキシダーゼ複合体は、前述のように調製した。ただし、 360 pmole のプロモアセチル化西洋ワサビペルオキシダーゼと 156 pmole の断片9とを、 $120 \mu\text{L}$ の 0.025M リン酸ナトリウム、pH7.5、中で結合させた。Blutip-dカラムにかける代わりに、この混合液をエバボレート・乾固し、 $1 \mu\text{L}$ の75%グリセロール、 $10 \mu\text{L}$ の水、そして $1 \mu\text{L}$ の1%プロモフェノールブルー混合液に懸濁させた。次いで、これを10%の天然タンパクゲルに流した。(Lindler, *Methods of Enzymol.*, (1983) 92:309)。 $5'$ - ^{32}P -リン酸断片9を用いて、対照実験を行った。酵素-DNA複合体は、結合していないペルオキシダーゼから(^{32}S で標識した、より速く流れるものとして)よく分離した。ゲルは、 100 mM Tris-

IV. 西洋ワサビペルオキシダーゼ-DNA複合体の合成

a. Blutipによる精製

西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)(2 塩: タイプ VI, Sigma: 10,000U/38mg)を、 0.5 mL の 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)に溶解させた。 $0\text{-ブロモアセチル-N-ヒドロキシスクシミド}(15 \mu\text{L})$ を上記溶液に加え、室温で30分間反応させた。この溶液を、 30 mL の 0.1M リン酸ナトリウム(pH7.5)であらかじめ平衡化したPD-10 SephadexG-25カラム(ファルマシア)に通した。褐色のフラクション(1~1.2 mL)を集めた。あらかじめ $3'$ - ^{32}S -ATPで上述のように $5'$ 位をチオリン酸化し、乾燥させた(30ピコモル)断片8 ($5'$ -GGTATTGTTGAACAATG TTGTACTTCTATTG-3')を、リン酸緩衝液 $50 \mu\text{L}$ 中に入れた。このチオリン酸化断片8溶液に、分画したHRPを加え、混合物を室温に30分放置した。この混合物をBlutip-d(Schleicher and Schuell)カラムに通した。ペルオキシダーゼ-DNA複合体はボイド体積に流出する(20%のカウントを回収

HCl, pH7.5, 50mM NaCl, $60 \mu\text{L}$ 30%過酸化水素水に、 60mg の4-クロロ-1-ナフトールを 20mL の冷メタノールに溶かした溶液を加えたもので染色した。この染色は、西洋ワサビペルオキシダーゼの活性に基づいているので、ペルオキシダーゼ-DNA複合体自体が活性であることを示すことが可能であった。コントロールである ^{32}P -断片9により活性のあるものはつくり出されなかった。

c. DNA-ペルオキシダーゼと相補DNAとのハイブリダイゼーション

$5'$ -チオリン酸化フラグメント11($5'$ -CCAAGAGCTGGTCATAATCTTGAAGCAAACCTACCGACAAGTTCCGACACCAACATGAGATCTGACCGACCGCTTC)を前述のように ^{32}P で標識した。10%過剰量の断片12(断片11に対して)を、 $5'$ -チオリン酸化した断片11とプロモアセチルペルオキシダーゼとの反応混合物に加えた。溶液は 60°C で3分間加热し、室温に冷却した。対照実験は、断片12とプロモアセチル化酵素を用い、 $5'$ -チオリン酸化断片11を除いたものを行った。ゲルは、断片11の反応混合物とプロモアセチル化酵素

とを標準試料とし、前述のように泳動させた。断片 2 + 酵素、および断片 11 は、泳動の遅い(断片 11 - ベルオキシダーゼ複合体と比較して)新しいバンドを示した。これは³²P 標識を含んでいた。このバンドにはまた、ベルオキシダーゼ活性があった。断片 12 - ベルオキシダーゼの対照実験では、酵素活性のある³²P でラベルされたバンドは見い出されなかった。

V. 分析

この分析において、断片はモデルシステムで示され、B 型肝炎ウィルスのゲノムの一部分を含む。この部分は、HBV DNA の 1403番目の塩基の BamH I 部位から、5' 方向に約 60 塩基対伸びたもの(断片 3)と、3' 方向に約 60 塩基対伸びたもの(断片 2)とを含む。分析物である断片 4 は、断片 3 の 3' 末端と断片 2 の 5' 末端に相補的である。固体支持体に結合した断片 3 は、III b 節で述べたようにして調製した。III b 節の初めの部分に記載した方法に従って、断片 2 の 5' 部分を $\gamma^{32}\text{P}-\text{ATP}$ で標識化した(断片 7 に適用)。

固体支持体は、BamH I 総衝液(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 7 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 2 mM 2-メルカブトエタノール)で 2 回洗浄し、20 μl の同じ緩衝液に再び懸濁させた。これに 1 μl の BamH I (BRRL; 5000 単位/715 μl) を加え混合した。37°C で 30 分間インキュベートし、上清および 1 回水洗した洗液を、処理された固体支持体の残る試験管から除去し、カウントした。次に、懸濁液を 20 μl および酵素 2 μl を加え、37°C で一晩放置した。上清と洗浄水はあらかじめカウントした。酵素の入っていない対照実験も行った。

表 2

	支持体の最初 のカウント (CPM)	脱離後 30分 (CPM)	脱離後 18時間 (CPM)
サンプル 1 w/酵素	69660	2064	10513
サンプル 1 w/o 酵素	67353	536	2524
(コントロール)			
サンプル 2 w/酵素	34982	1848	6336
(コントロール)			
サンプル 2 w/o 酵素	44113	504	2191
(コントロール)			

a. ハイブリダイゼーション、プローブの捕捉 約 3 pmole の、支持体に固定された断片 3(0.3 mg) の懸濁液と、5 pmole の³²P-断片 2 (10 μl H₂O 中) とを、それぞれの実験に使用した。適量の試薬(表 1 参照)を加え、最終容量を 50~100 μl とし、90°C に加热し、1 時間以上にわたり室温にまで放冷した。室温にて 4 × SSC で洗浄後、支持体に固定したサンプルをベックマン LS7000 液体シンチレーションカウンターにより、チエルネンコフ(Cherenkov)で測定した。

表 1

	断片 4 の pmole, μl	20 × SSC (μl)	H ₂ O(μl)	結合 CPM
A	0.0	8	20	31,260
B	1.10	8	10	132,293
C	0.5.5	8	15	113,039

b. 制限酵素処理

典型的には、上記のようにプローブと結合した

VI. PCL(過ヨウ素酸塩開裂リンカー)の調製

0.0 ジベンゾイル酒石酸一水和物(18.8 g, 50 mmole)を 250 ml の CH₂CN に溶かし、溶媒を減圧下で除去した。この操作を繰返した。得られたオイルを 250 ml の THF に溶かし、ジンクロヘキシリカルボジミド(DCC)10.6 g(50 mmole)を 50 ml THF に溶かしたものに加えた。数分以内に、沈殿が生じ始めた。20°C で 18 時間攪拌した後、反応液を濾過し沈殿を少量の THF で洗浄した。次に沈殿を減圧下で乾燥させると、10.8 g(100%, 50 mmole)のジンクロヘキシリウレア(DCHU)が得られた。滤液に、2-(N-メチル)アミノエタノール(4.0 ml, 50 mmole)を加え、反応液を 20°C で 1 時間攪拌した。次に、DCC(10.6 g, 50 mmole)を 50 ml の THF に溶かしたものに加えると、少量の沈殿を生じた。約 1 時間後に、2-(N-メチル)アミノエタノール(4.0 ml, 50 mmole)を加え、反応液を 20°C にて、18 時間攪拌した。生じた沈殿をしばしば濾過し、少量の THF で洗浄した。乾燥させた DCHU の沈殿は 10.8 g(100%)であった。滤液を合併し、エバボレートして油状

とした。シリカのクロマトグラフィーにより、8 g (17mmole) の0,0-ジベンゾイル酒石酸ジ(N-メチル-2-ヒドロキシエチル)アミド(I)を得た。生成物は6%のメタノール/ジクロロメタンで溶出させた。

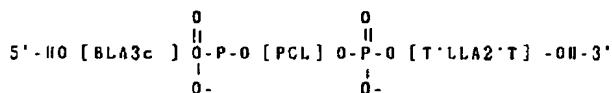
ジメチルアミノビリジン(DMAP)0.11gとトリエチルアミン(TEA)2.4moleとを含むI(8.6mmole)に、50moleのCH₂Cl₂に溶かしたDMT-Cl(8.6mmole)を滴下した。DMT-Clを加えた後、反応混合物を20℃にて1時間攪拌した。溶液はエバボレーションによって除去した。残渣を600moleの酢酸エチルに溶かし、有機相を400moleの5%炭酸水素ナトリウムと400moleの80%飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。有機相を固体の硫酸ナトリウム上で乾燥した。30分後に、硫酸ナトリウムを滤過し、上清を油状に濃縮し、トルエンおよびCH₃CNと共にエバボレートした。

粗製の物質をシリカゲルクロマトグラフィーにより、n-ブタノール/CH₂Cl₂で溶出させた。純粋なモノ-DMT生成物は、2~3%n-ブタノール/CH₂Cl₂

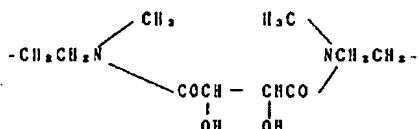
で溶出し、1.53g(2mmole)の0,0-ジベンゾイル酒石酸2-(O-ジメトキシトリチル)ヒドロキシエチル-N-メチル-N-メチル-2-ヒドロキシエチルジアミンを得た。

この物質をジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)3mmoleを含む20moleのCH₂Cl₂に溶かした。10℃にまで冷却し、2.2mmoleのメトキシ-N,N-ジイソプロピルアミノクロロホスフィンをアルゴン下で加えた。15分後に酢酸エチルを加え、有機相を80%飽和塩化ナトリウムで洗浄し、固体の硫酸ナトリウム上で乾燥し、エバボレーションにより乾燥した。トルエンと乾燥CH₃CNとの共エバボレーションの後、残渣を10moleの乾燥CH₂Cl₂に溶かした。この溶液を19本の乾燥したHeatonバイヤルに分注し、溶液を減圧下で除いた。バイヤルはネジ付キャップでしめて-20℃で保存した。

DMT-PCL-ホスホルアミダイトをオリゴヌクレオチドに常法によりカップリングした。次のオリゴヌクレオチドを合成した。



上記構造において、“PCL”は過ヨウ素酸開裂性の結合を示す。



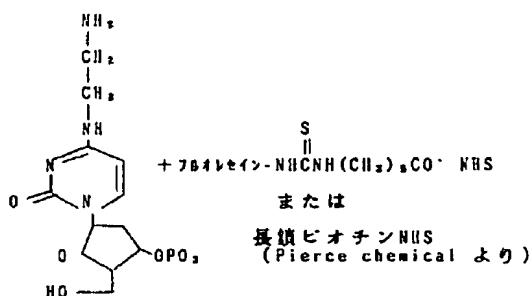
* BLA3c*はヌクレオチド配列5'-GATGTGGTTGTGG TACCT-3'を示し、*T'LLA2'TT*はヌクレオチド配列5'-TTGACACGGGTCTATGCCATAAT-3'を示す。完全に脱保護化した後、オリゴヌクレオチドをPAGEによって精製し、生成物のバンドを切りとり、ME緩衝液にて溶出させ、SEP-PAKカートリッジで、Sanchez-Pescadorら、DNA 3:339-343 (1984)の方法により脱塩した。

分解は次のように行った：約0.600の精製した物質(6λ H₂O中)を、50λ 0.1M NaIO₄で処理し、20℃にて1時間放置した。水(1λ* / ml)に入った0.4moleのグリセロール水溶液を加えた。溶液を合併し、0.1M酸膜トリエチルアンモニウム(TEAA)で平衡化したPD-10カラム(Sephadex G25)に通し、同じ緩衝液で溶出した。0.5mlのフラクションを集め、Speed-Vacによって溶液を除去した。15% PAGEによる分析で、出発物質は、予想していた大きさの2つのバンドに完全に分解していた。

(以下余白)

VI 過ヨウ素酸ナトリウム脱離

A. ^{32}P でラベルされたプローブは、Nucleic Acids Research 16(1988)で Urdea らより記載されたとおりに調製した。このプローブの配列は、AAGTACCGACAACCACATCCGATGCCCTCGGATCGACCT \cdot T- ^{32}P ($5' \rightarrow 3'$) であった。ここで、 \cdot は、特開昭62-188970号(前出)に述べられた修飾ヌクレオチドであり、この修飾ヌクレオチドは、次の構造を有する：



GATCTGGTTGTCGTACCTCTTCTTGGAGAAAGTGGTG ($5' \rightarrow 3'$) という配列の合成オリゴヌクレオチドが分析物として使われた。マイクロタイマー捕捉ウェル (Micro-

ラム(PD-D; Pharmacia)にかけた。カラムのボイドボリュームが $1 \times \text{PBS}$ で最終容積が 35 ml となるまで希釈された。各ウェルに、捕捉プローブ(capture probe)溶液 $50 \mu\text{l}$ を添加した。プラスチックラップでカバーした後、ウェルを室温で暗所にて 30 分～一晩中インキュベートした。これらのウェルは、ハイブリダイゼーション混合物でおおわれていなかった。

1 fmole, 100 amoles および 10 amoles の分析物断片を含有するストック液は、 $4 \times \text{SSC}$ を含むハイブリダイゼーション緩衝液で調製した。コントロール液は同様に調製されたが、これには分析物は含有されない。4 組のウェルを調製した。各ウェルに $40 \mu\text{l}$ の選択溶液を加えた。この選択溶液には、1 fmole, 100 amoles, 10 amoles の分析物または分析物を含有しない液が含まれる。ハイブリダイゼーションは 55°C の水溶液中で 1 時間行なった。チューブは蓋をし、ウェルも粘着性の Liabro/Titertek 膜でシールした。 $380 \mu\text{l}$ の $4 \times \text{SSC}$ で 2 度洗浄した後、10 fmoles の ^{32}P -標識され

titer capture well) は、2 つの異なるプローブを用いて下記の方法により調製した：(1) "CACCAC TTTCTCCAAAGAACG (下記の表 3 で XTI*1ca と命名された)；および(2) "TT-X-CACCACTTTCTCCAAAGAACG (X は上述のアルカリアミンスクレオチドを示す)。ここで、"X" は前の節に述べられたように、過ヨウ素酸脱離可能な結合を示す。このマイクロタイマー捕捉ウェルは、 $200 \mu\text{l}$ の $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ ポリフェニルアラニルリジン(Sigma Chemical Inc.)の水溶液を各ウェルに加えることにより、イミュロン II ストリップから調製した。カバーされたストリップを室温に 30 分から 2 時間保持し、上述のように洗浄を行なった。上述の 3B オリゴヌクレオチドの 10 fmole サンプルを含有する $60 \mu\text{l}$ の $1 \times \text{PBS}$ を、10 mg のエチレングリコールビス(スクシミジルースクシネット)(Pierce Chemical Inc.)を含む $140 \mu\text{l}$ の DMP で処理した。この混合物をポルテックスで攪拌し、室温にて暗所でインキュベートした。15 分後にこの溶液を、あらかじめ 30°C の $1 \times \text{PBS}$ で平衡化したセファデックス G-25 カ

たプローブを含む $4 \times \text{SSC} 40 \mu\text{l}$ を加えた。ウェルを 37°C で 1 時間インキュベートした後、再び $380 \mu\text{l}$ の $4 \times \text{SSC}$ で 2 度洗浄した。

^{32}P の総カウントは、LKB 1214 Rackbeta シンチレーションカウンターで測定した；その結果を表 3 の「総カウント」の項に示した。

過ヨウ素酸脱離可能なポリヌクレオチドを含有する 1 組のウェル、および XTI*1ca 溶液を含む 1 組のウェルに、 $100 \mu\text{l}$ の $4 \times \text{SSC}$ に溶かした 100mM NaIO_4 液を加えた。ウェルを室温で 1 分間インキュベートした。この過ヨウ素酸溶液を新しいウェルに移し、カウントした。結果を表 3 の「 100mM NaIO_4 」および「 $4 \times \text{SSC}$ 」の項に示す。

コントロールとして、 $100 \mu\text{l}$ の $4 \times \text{SSC}$ を過ヨウ素酸脱離可能なポリヌクレオチドを含有する 1 組のウェルに加えた。次に、ウェルを室温で 1 分間インキュベートし、溶液を新たなウェルに移した。この移した溶液をカウントし、その結果を表 3 の「XTI*1ca ウェル」の項に示す。

表 3

分析物量	蛍光カウント	X射線吸収		
		100mM NaIO ₄	4X SSC中	9×S _B
1 fm	8378.80	563.49	71.79	53.84
	3440.30	465.74	29.91	43.87
	3368.20	638.29	23.93	41.88
100 am	3130.60	53.84	43.87	57.83
	5661.70	66.81	82.76	48.87
	3068.50	47.86	26.92	23.93
10 am	3119.60	17.94	36.89	35.90
	7161.20	52.85	54.84	36.9
	2408.61	20.94	17.94	34.9
0	3133.49	34.90	129.64	32.91
	5729.60	38.89	22.93	43.88
	3613.92	14.95	32.90	58.84

S/N 比	脱離なし	脱離
1 fmole	1.2 +/- 0.8	18.8 +/- 8.6
100 amoles	1.0 +/- 0.5	1.9 +/- 0.9
10 amoles	1.0 +/- 0.7	1.0 +/- 0.8

B. 第2の実験は、以下のように変更を加え、前述と同様の手法で行なった：(1)使用したプローブは、³²P-CGTGTCAGGCATAGGAC(5'→3')。*は前述と同意義を有する）という配列を有する³²P-標識化19量体であった；(2)分析物は、CGTCCTATGCCGAGACACCCTTCTTTGGAGAAAGTGGTG；という配列を有する合成オリゴヌクレオチドであった；(3)分析物の濃度は、3つ測定するのではなく、1つであった；(4)³²P-標識化プローブは、10fmolでなく、100 fmolであった。結果を表4に要約して示す。

(以下余白)

表 4

分析物量	蛍光カウント	100mM NaIO ₄	
		4X SSC中	4X SSC
1 fm	1885.95	582.44	93.97
	1963.40	581.44	97.72
	2130.60	346.05	119.66
	1877.20		
	1692.90		
0	1666.98		
	710.60	50.85	64.81
	762.70	36.89	39.88
	731.60	31.91	55.84
	1030.35		
	554.52		
S/N 比	892.57		
	2.40 +/- 0.55	12.6 +/- 4.59	

VII. ストランド（鎖）置換

アルカリホスファターゼプローブは、Nucleic Acids Research 16, で Urdea らにより記載された方法により調製した。このプローブは、AACTACGGACAAAC CACATCGGATGACCTCGGATCCACCT*T(5'→3') という配列を含む。*は上記と同意義を有する。GATGTG GTTGTGCGTACTTCTTCTTGGAGAAAGTGGTG(5'→3') の配列を有する合成オリゴヌクレオチドを分析物として用いた。第2の合成オリゴヌクレオチドは、CTTCTTGGAGAAAGTCGTGTTCATAGAGAAACGATATAAGAC ACACGATATAAGGGATAの配列を有し、特異的な脱離ストランド、つまり、上述のように標識を脱離させる置換ストランドとして使用した。*TATCCCCTA TATCGTGCTCTATATATCGTTCTCTATGAACACCACTTCTC CAAAGAACGの配列を有するオリゴヌクレオチド捕捉プローブとして使用し、プレートを作成した。Micro-litewell (Dynatech) を使用したこと以外は、前節に述べられたようにウェルを調製し、そして、最後のインキュベーション工程後、ウェルを 1× PBS で洗浄し、H₂O でおおったのち、再び洗

浄した。

3組の捕捉ウェルが調製され、各組は、分析物含有ウェルおよびコントロールウェル(つまり分析物を含まないウェル)を包含する。各ウェルに1 fmolの分析物または分析物を含まない40 μlの4×SSCを加えた。ハイブリダイゼーションを55°Cにて1時間行った。380 μlの4×SSCで2度洗浄した後、100 fmolsのアルカリホスファターゼプローブを含有する40 μlの4×SSCをウェルに加えた。ウェルを37°Cで1時間インキュベートした後、洗浄を行なった。つまり、(1)0.1×SSCと0.1%SDSとを含有緩衝液380 μlで2度洗浄を行ない、(2)4×SSC 380 μlで2度洗浄を行なった。

アルカリホスファターゼ活性は、化学発光物質であるジオキセタン(dioxetane)とのインキュベーションにより測定した。発光はマイクロタイターディッシュリーティングルミノメーター(Dynatech)を使用して記録した。

1組のウェルに、20 μlの4×SSCを加えて、次に、37°Cで1時間インキュベーションした。20

μlのジオキセタンを加え、また37°Cで再び1時間インキュベートした。アルカリホスファターゼ活性を測定し、その結果を表5の「移動なし」の項に示す。

20 μlの4×SSCを第2の組のウェルに加え、37°Cにて1時間インキュベートした。個々の溶液をMicrolite I ウェルに移し、20 μlのジオキセタンを加えた。これらのウェルを再び37°Cで1時間インキュベートした。アルカリホスファターゼ活性を上記のように測定し、その結果を表5「SSC脱離」の項に示す。

20 μlの4×SSCを第3の組のウェル(30 pmolesの特異的な脱離オリゴヌクレオチドを含有する)に加えた。ウェルを37°Cにて1時間インキュベートした後、この溶液をMicrolite I ウェルに移した。20 μlジオキセタンを加え、ウェルを37°Cにて1時間インキュベートした。アルカリホスファターゼ活性を上記のように測定し、その結果を表5の「オリゴ脱離」の項に示す。

表5

分析物量	移動なし	SSC		オリゴ 脱離
		脱離	脱離	
1 fm	16.26	0.47	9.52	
	14.66	0.56	9.89	
	15.76	0.55	10.42	
0	0.33	0.04	0.08	
	0.33	0.04	0.05	
	0.28	0.04	0.07	
S/N 比	移動なし	SSC 脱離	オリゴ 脱離	
1 fmole	49.66 +/- 5.27	13.17 +/- 1.23	149.15 +/- 34.84	

B. 第Ⅳ節Aの実験を繰り返して行ない、その結果を表6に示す。

表6

分析物量	移動なし	SSC		オリゴ 脱離
		脱離	脱離	
1 fm	11.92	0.20	4.05	
	12.39	0.18	5.02	
	12.72	0.19	4.79	
0	0.98	0.07	0.10	
	1.09	0.06	0.11	
	1.11	0.08	0.10	
S/N 比	移動なし	SSC 脱離	オリゴ 脱離	
1 fmole	11.6 +/- 0.88	2.7 +/- 0.4	46.2 +/- 6.9	

上記結果より、本法は、簡単、迅速、そして正確に種々の試料から特異的なポリスクレオチド配列を検出する手段を提供することが明らかである。この方法は異なった型の標識（それは、免疫分析に使用されてきた検出可能な信号を包含する）を与えることにおいて、高い感度と広い柔軟性を与える。従って、本法は、免疫分析のための従来の装置に容易に適用し得る。これらの装置は、放射能活性、分光光度計における吸光度、蛍光光度計あるいはシンチレーションカウンターにおける光放射を検出することが可能である。本法は、どのようなDNA配列にも適用が可能であり、そして、比較的短いプローブを使用して偽陽性を減らし、好ましくないヘテロ二本鎖化を最少にするために用いられ得る。測定のために支持体から標識を開裂させることにより、バックグラウンド値を大幅に減らし得る。なぜなら、読みとりが支持体から離れて行なわれるためである。さらに、ポリスクレオチド鎖から標識を開裂させる必要性に基づいてバックグラウンドの問題をさらに注目する必要

がある。本法は、従って、病気を診断すること、ハイブリッドDNA操作をモニターすること、遺伝的特徴を決定することなどのために正確で経済的なDNA配列を決定することを提供する。

上記に記載された発明は、その理解を明確にするために、いくぶん詳細に記載されている。しかし、添付の特許請求の範囲内でその改変や修飾がなされ得ることは明らかである。

(以下余白)

(発明の要約)

核酸分析の新規方法が提供される。この方法において、分析物における目的とする配列と実質的に相同性を有するオリゴスクレオチド配列を持つポリスクレオチドを用い、あらかじめ決められた程度の厳密な条件下でハイブリダイゼーションを行うかまたは行わずに、支持体から標識を脱離させる。特に、種々の手法が、支持体に標識を結合し、そして、一本鎖または二本鎖の開裂により、支持体から標識を脱離するために用いられる。その標識の脱離は、試料中の特定のオリゴスクレオチド配列の存在の指標として検出される。この方法は病気の診断、遺伝的モニター、そして核酸混合物の分析に有用である。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、固体支持体に対する標識の特異的結合および非特異的結合の相違を示す。第2図Aから第2図Dまでは、本発明の好適な方法を模式的に示す説明図であり、選択的に切断可能な部位が、支持体と標識の間に、分析とプローブとの複合体

を介して導入されることを示す。

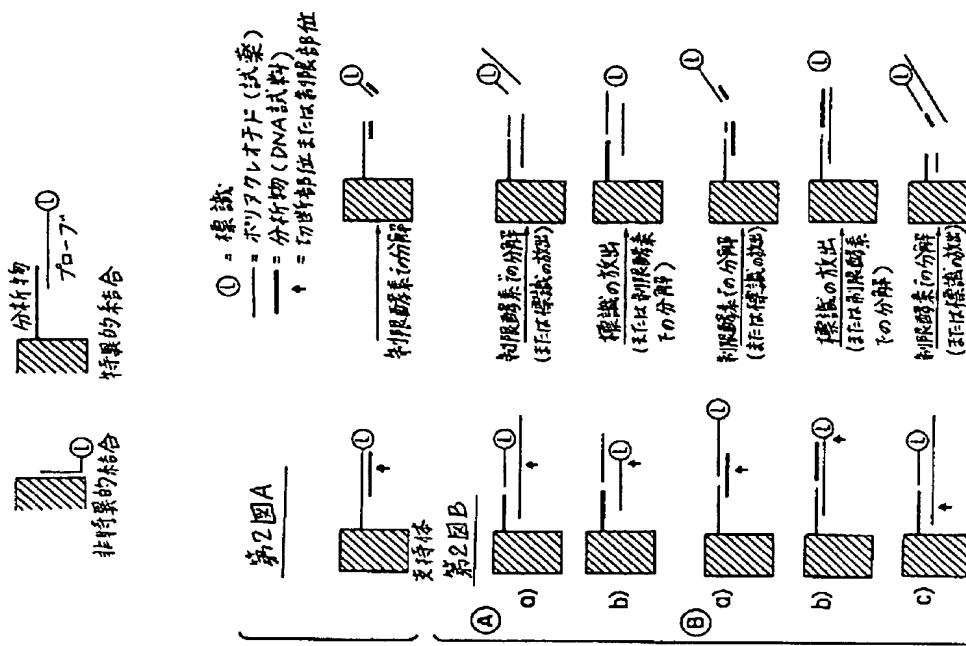
第3図は、本発明の別の方法を模式的に示す説明図であり、特異的に結合した標識が、鎖置換技術によって、脱離することを示す。

以上

代理人 弁理士 山本秀策

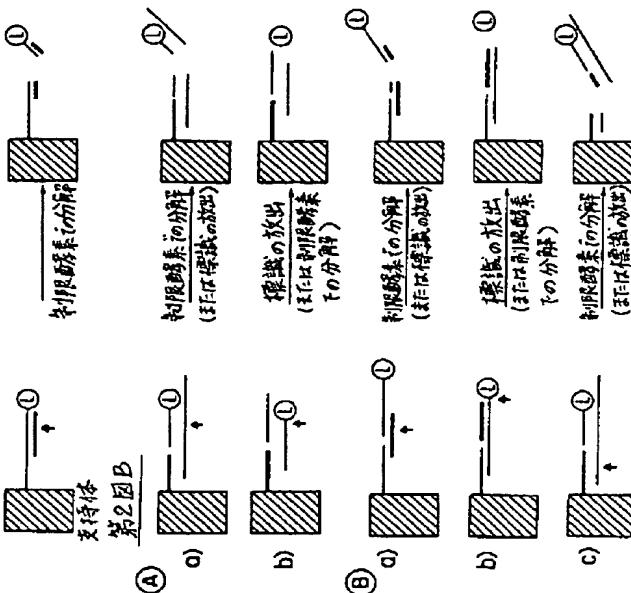
図面の添付(内容に変更なし)

第1図



第2図A

第2図B



手続補正書(方式)

平成元年2月22日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和63年特許願第250726号

2. 発明の名称

選択可能な切断部位を用いたポリスクリオナドの測定

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608

エミリービル、ホートン ストリート 4560

名称 チロン コーポレイション

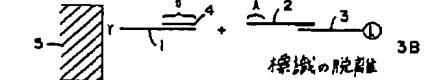
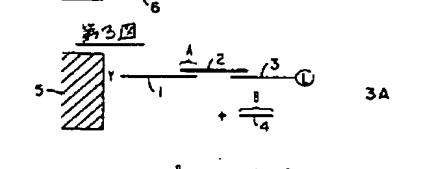
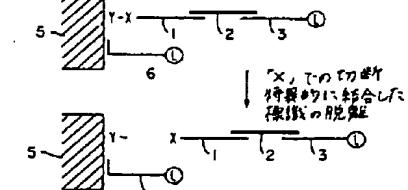
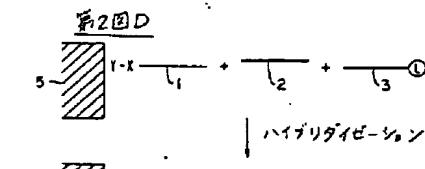
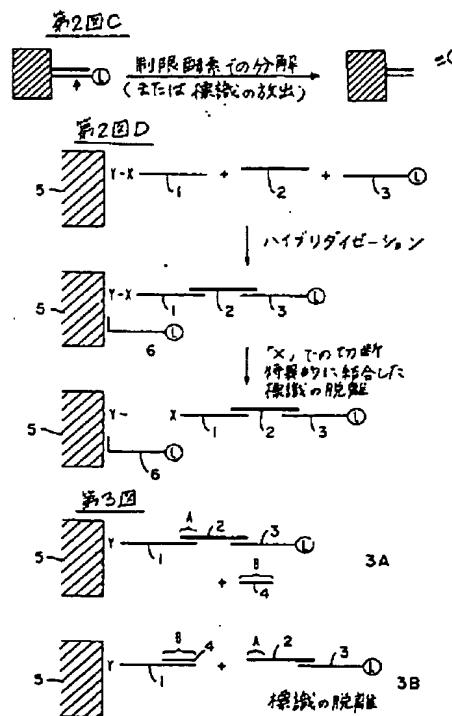
4. 代理人

住所 千530 大阪府大阪市北区西天満

6丁目1番2号 千代田ビル別館4階

氏名 (7828) 弁理士 山本秀策

電話(大阪) 06-361-1139



5. 指正命令の日付（発送日）

平成元年1月31日

6. 指正の対象

願書の特許出願人の代表者の欄、委任状
(訳文添付) および図面(全図)

7. 指正の内容

願書と委任状については別紙のとおり
図面については願書に最初に添付した図面
の墨書き・別紙のとおり(内容に変更なし)